한국동물분류학회지 제13권 제2호
The Korean Journal of Systematic Zoology
Vol. 13, No. 2: 73-81 (June 1997)

한국산 박새속 4종의 미토콘드리아 DNA 분석

민 미 숙
(인하대학교 이과대학 생물학과)

적 요

한국산 조류 중 박새속(genus *Parus*)에 속하는 4종 *Parus major wladiwostokensis*(박새), *P. ater amurensis*(진박새), *P. palustrius hellmayri*(쇠박새) 및 *P. varius varius*(곤줄박이)를 대상으로 이들의 계통적 유연관계를 구명하기 위하여 mtDNA 분석을 실시하였다.

6 base를 인지하는 10개의 제한효소를 처리하여 얻어진 mtDNA의 크기는 16.6~17.0Kb였으며 *Pst* I과 *Pvu* II는 종간 차이가 뚜렷하였다. 각 종간의 절편양상을 비교하여 *Parus*속의 종간 분화정도를 비교한 결과 *P. m. wladiwostokensis*와 *P. a. amurensis*의 유전적 근연관계가 가장 가까왔고(p=0.073, F=0.294) *P. a. amurensis*와 *P. v. varius*는 비교적 현저한 유전적 차이를 보였다(p=0.119, F=0.143). Brown 등(1979)의 공식을 이용하여 박새속 4종의 분화시기를 추정한 결과 이들은 후기 선신세(Pliocene)와 초기 홍적세(Pleistocene) 사이에 분화된 것으로 추정되었다.

Key words: *Parus*, mitochondrial DNA, species comparison

서 론

참새목(Passeriformes) 조류는 지질학적으로 비교적 최근인 신생대 제 4기 홍적세(Pleistocene)에 종분화가 급속히 이루어진 분류군으로 매우 많은 종을 포함하고 있다(Raikow, 1986). 이들 참새목 조류 중 한국산 박새과(Paridae)에 속하는 박새속(genus *Parus*)에는 *Parus major wladiwostokensis*(박새), *P. ater amurensis*(진박새), *P. palustrius hellmayri*(쇠박새) 및 *P. varius varius*(곤줄박이) 등 4종이 있다. 이들은 한반도 전역에 분포한다. 한국산 박새속 조류는 형태적 변이가 다양하기 때문에 학자에 따라 분류체계를 달리하여 많은 혼란이 있어 왔다(Kang, 1962; Won, 1969, 1981; Wetmore, 1960; Won and Gore, 1971).

* 본 연구는 1992년도 인하대학교 대학원 Post-Doc. 연구지원에 의한 것임.

그러나 최근 조류를 포함한 척추동물군에 대한 계통적 유연관계를 조사하기 위하여 형태나 생태적인 연구 이외에도 유전학적인 형질을 이용한 연구가 많이 진행되고 있으며 특히 동위효소를 이용한 계통연구가 활발히 이루어지고 있다(Avise and Lansman, 1983; Yang *et al.*, 1984; Zink *et al.*, 1987; Dowling and Brown, 1989; Johnson *et al.*, 1989). 국내에서도 Kim 등(1986)은 한국산 박새속 조류에 대한 형태형질 및 동위효소 분석을 통하여 제주도와 본토의 박새가 아종 관계임을 재확인 하였고, Park 등(1990)과 Shim(1994)은 상기의 방법으로 박새속의 종간 유연관계를 분석한 바 있다. 한편, mtDNA는 모계유전물질로 핵내 DNA보다 빠른 진화속도를 가지고 있으며, 제한효소 분석으로 얻어지는 염기치환률(*p*)은 생물군의 계통진화적 연구에 유용한 것으로 알려져 있다(Yonekawa *et al.*, 1981; Bermingham and Avise, 1986; Moritz *et al.*, 1987; Palmer, 1987; Gill *et al.*, 1993). 국내에서도 어류(Lee *et al.*, 1989; Hong *et al.* 1993; Min and Yang, 1993), 양서류(Lee and Park, 1991), 파충류(Paik *et al.*, 1992) 등 많은 분류군의 계통연구에 이용된 바 있다.

본 연구는 *Parus major wladiwostokensis*, *P. ater amurensis*, *P. palustrius hellmayri* 및 *P. varius varius* 등 박새속 4종의 종간 계통적 유연관계를 mtDNA 분석방법을 통하여 조사하였으며, 기존에 발표된 유전학적 분석 결과(Kim *et al.*, 1985; Park *et al.*, 1989; Shim, 1994)와 비교하였다.

재료 및 방법

본 실험에 사용한 재료 및 채집지역은 Table 1과 같다.

Table 1. Collection localities, dates and number of specimens.

Species	Localities	No. of specimens	Collection date
1. *P. major wladiwostokensis*	Chongryang-ri, Seoul	2	Feb. 2. 1993
2. *P. ater amurensis*	Chongryung-ri, Seoul	2	Feb. 2. 1993
3. *P. palustrius hellmayri*	Kwangreung, Kyonggi-do	7	Feb. 21. 1993
4. *P. varius varius*	Chongryang-ri, Seoul	2	Feb. 2. 1993
	Kwangreung, Kyonggi-do	2	Feb. 21. 1993

실험재료는 새그물(Mist net)을 사용하여 채집한 후 생체로 실험실로 운반하여 연구시료로 이용하였다. 조직 중 미토콘드리아의 함량이 높은 간, 심장을 적출하여 Zimmerman 등(1988)의 방법을 이용하여 mtDNA를 추출하였다. 세포를 파괴하기 위해 2g 정도의 조직을 homogenize 완충액(0.24M Sucrose, 0.01M EDTA, pH 7.4)에서 마쇄하고 핵과 세포질 물질의 분리를 위해 농도구배를 주어 원심분리 한 후 시료에 남아있는 염색체 DNA와 RNA 제거를 위해 DNase I과 RNase A를 처리하였다.

10% NP-40을 이용하여 미토콘드리아의 막을 파괴한 후 원심분리하여 상층액을 추출하고 mtDNA 정제과정을 거쳐 70% ethanol로 세척시킨 후 건조시킨 다음 TE buffer로 희석하고 Avise 등(1984)의 방법에 따라 6base를 인지하는 10개의 제한효소를 처리 한 후 Mack 등(1986)의 방법에 의하여 0.8% agarose gel 전기영동을 하였다. 전기영동 후 이동된 DNA절편을 ethidium bromide(EtBr)로 염색하여 UV-illuminator상에서 절편을 확인한 후 사진을 촬영하였다. 종간 유연관계의 분석은 Upholt(1977)의 방법에 따라 각 DNA절편의 이동도에 따른 절편 유사성(F)과 염기서열 분화정도(*p*)를 구하여 사용하였다.

결 과

박새속 4종에 대한 mtDNA를 추출하여 6base를 인식하는 10개의 제한효소를 처리하여 mtDNA 절편을 분석하였다. 절편양상에서 각 절편 크기의 합으로 구한 박새속 4종의 mtDNA size는 16.6~17.0Kb 사이 (*Parus major wladiwostokensis* 17.0±0.35, *P. ater amurensis* 16.8±0.48, *P. palustrius hellmayri* 17.0±0.63 *P. varius varius* 16.6±0.89)로 비슷한 크기를 가지는 것으로 나타났다. 10개의 제한효소를 처리한 후 전기영동에서 얻어진 절편양상에 따른 총 절편수와 각 종간 공통 절편수를 구한 결과는 Table 2와 같다.

Table 2. Comparative analysis and estimated number of mtDNA fragments of 4 species of the genus *Parus*.

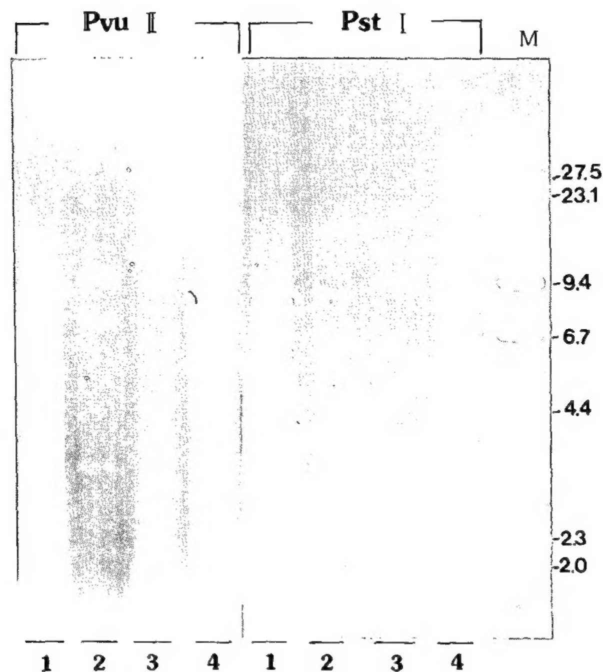
RE	1	2	3	4	1/2	1/3	1/4	2/3	2/4	3/4
Ava I	6	5	5	4	4	4	1	4	1	2
Bgl I	4	4	4	3	1	1	0	0	1	0
Bgl II	3	2	1	2	1	0	1	0	0	0
Cal I	2	1	1	2	1	1	0	1	0	0
Hind III	4	3	1	3	0	0	0	0	1	0
Pst I	2	3	4	1	0	0	0	0	0	0
Pvu II	4	3	1	3	0	0	0	0	0	0
Xba I	1	1	1	2	1	0	0	0	0	0
Eco RI	1	4	2	2	0	0	1	0	0	0
Bam III	2	1	1	1	0	0	0	0	0	1
Total	29	26	22	23	8	6	3	5	3	3

1. *P. major wladiwostokensis* 2. *P. ater amurensis* 3. *P. palustrius hellmayri* 4. *P. varius varius*

*P. m. wladiwostokensis*의 총 절편수는 29개로 가장 많은 반면 *P. p. hellmayri*는 22개로 가장 적은 절편수를 보였다. *Hin* dIII, *Xba* I, *Eco* RI, *Bam* HI 등은 종간 공

통절편수가 1개 이하로서 종간에 차이가 있었으며, 특히 *Pst* I과 *Pvu* II는 종 특이성을 보였다(Fig. 1).

Fig. 1. MtDNA variation of the genus *Parus* digested with *Pst I* and *Pvu II.* Numbers refer to sample localities listed in Table 1.



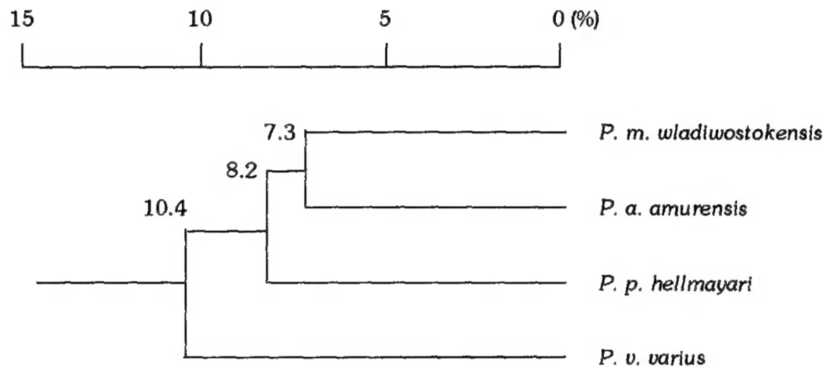
각 종간 평균 공통절편수는 4.67(3∼8)이었으며, *Parus m. wladiwostokensis*와 *P. a. amurensis*가 8개로 가장 많은 공통절편을 보유하고 있어 가장 유사성이 높았으며 *P. varius varius*와 나머지 3종간에는 공통절편수가 각각 3개로서 적게 나타났다. 이러한 공통절편수를 토대로 Upholt(1977) 공식에 의한 공통절편의 비율(F)과 염기치환율(p)을 구한 결과는 Table 3과 같다.

Table 3. Estimates of mtDNA differentiation among 4 species of the genus *Parus*. Date above the diagonal are total proportions of shared restriction fragments(F), and those below the diagonal are the value of nucleotide sequence divergence(p) (Upholt, 1977).

Species	1	2	3	4
1. *P. major wladiwostokensis*	-	0.294	0.270	0.210
2. *P. ater amurensis*	0.073	-	0.284	0.143
3. *P. palustrius hellmayri*	0.079	0.084	-	0.194
4. *P. varius varius*	0.094	0.119	0.099	-

*P. m. wladiwostokensis*와 *P. a. amurensis*의 경우 F=0.294 (p=0.073)로 가장 가까운 유사성을 보였으며 *P. a. amurensis*와 *P. v. varius*가 F=0.143 (p=0.119)로 종간 관계가 제일 멀었다. Table 3의 염기치환율을 토대로 하여 *Parus*속 4종의 계통적 유연관계를 dendrogram으로 작성한 결과는 Fig. 2와 같다.

Fig. 2. Genetic phenogram of the genus *Parus* based on analysis of mtDNA nucleotide sequence divergence(p) among 4 species of the genus *Parus*.



고 찰

한국산 박새속 4종의 mtDNA 크기는 16.9 Kb로서 일반적인 척추동물의 mtDNA 크기 범위(15.7-23.0 Kb)내에 속하였으며 조류에서 알려진 mtDNA의 크기(16.5 Kb)와 유사하였다(Kessler and Avise, 1985; Lamb *et al.*, 1989; Lee *et al.*, 1994). MtDNA분석에서 산출된 염기서열의 종간 분화정도는 형태적으로 유사한(Shim, 1994) *Parus major wladiwostokensis, P. ater amurensis, P. palustrius hellmayri*가 평균 p=0.079(0.073-0.084)로 비교적 가깝게 나타난 반면 *P. varius varius*는 나머지 3종과 평균 p=0.104(0.094-0.119)로 다소 멀게 나타났다. 한국산 *Parus*속 4종간의 평균 p값은 0.091로 동일종은 아니나 Mack 등(1986)과 Gill 등(1993)에 의해 조사된 같은 *Parus*속내 종간 염기서열 분화정도인 p=0.07(0.04-0.09), p=0.05(0.03-0.07)에 비하여 다소 높게 나타났으며, 다른 조류 중 물새류(Kessler and Avise, 1984)의 *Anas*속 9종간의 p=0.062(0.004-0.085), *Aythya*속 4종간의 p=0.034(0.025-0.043) 그리고 참새류 *Ammodramus*속(Zink and Avise, 1990) 8종간의 p=0.073(0.021-0.109) 등에 비하여도 다소 높게 나타났다. 또한 국내외에서 연구된 타 생물군 특히 한국산 *Zacco*속(Lee *et al.*, 1989)이나 *Salmo*속 4종(Gyllensten and Willson, 1987), *Moroco*속 3종 등 어류와 *Agkistrodon*속 4종(Lee *et al.*, unpublished) 등 파충류에서 보이는 종간 평균 p값과 유사한 값을 나타내었다. 그러나 어류의 *Lepomis*속 9종(p=20.1%)(Avise and Saunder, 1984)이나, 한국산 *Rana*속 양서류 4종(p=19.2%)(Park, 1990), 설치류인 *Peromyscus*속(p=14.1%), *Rattus*속

(p=16.2%)(Brown and Simpson, 1984) 등은 훨씬 높은 값을 보인다.

한편, 본 연구와 동일한 박새속 4종의 isozyme 분석 결과(Shim, 1994)에서는 *P. m. wladiwostokensis*와 *P. a. amurensis* 그리고 *P. p. hellmayri*와 *P. v. varius*가 각기 두 개의 군으로 grouping되어 나타나 상기의 본 연구결과와는 다소 차이가 있었다. 일반적으로 mtDNA의 분석 결과로 얻어지는 생물군의 유전적 근연정도는 isozyme 분석 결과와 대체로 유사하다고 알려져 있으며, 그 예로 한국산 피라미아과(Danioninae) 어류 3속 5종(Lee *et al.,* 1989; Yang and Min, 1989)과 *Moroco*속 어류(Min *et al.,* 1995) 등을 들수있는데 이들은 모두 isozyme 분석상의 유전적차이가 mtDNA상에서도 그대로 반영되어 나타나는 결과를 보여 주었다. 그러나 일부 생물군에서는 본 연구의 *Parus*속과 같이 mtDNA와 isozyme의 분화양상에 차이를 보이는 경우도 있는데 (Park, 1990; Park and Lee, 1991), 이러한 현상은 mtDNA와 핵 DNA간에 염기치환 속도의 차이와 유전적인 특성의 차이에 기인되는 것으로 보인다. 특히 모계유전 (haploid) 물질로 진화속도(evolutionary rate)가 핵 유전물질에 비해서 빠른 mtDNA의 경우는 종간의 유전적 차이를 크게 유발할 수 있는 반면, 핵물질의 산물인 isozyme의 경우는 암·수의 유전자가 동시에 관여함으로 종간의 차이가 mtDNA보다 적게 나타날 수가 있다(Min and Yang, 1993; Min *et al.,* 1995).

MtDNA 분석에 의한 분화연대 추정은 Brown 등(1979)이 포유동물을 대상으로 100만년 마다 2%의 염기서열에 치환이 일어나 분화된다고 추정하였고 이후 Vawter와 Brown(1986)이 다른 척추동물에서도 유사한 비율로 이 값이 유지됨을 시사한 바 있다. 이들의 추정을 고려한다면 *P. v. varius*는 나머지 3종 *P. m. wladiwostokensis, P. a. amurensis* 그리고 *P. p. hellmayri*와 600만년전에 분화하였을 것이라 추산할 수 있다. 또한 나머지 종들도 약 350만년에서 400만년 사이에 분화가 일어났을 것이라 추산되어 이들 4종은 후기 선신세(Pliocene)와 초기 홍적세(Pleistocene)시기에 분화되었다고 추정된다.

참고문헌

Avise, J. C. and N. C. Saunder, 1984. Hybridization and among species of sunfish (*Lepomis*) : analysis by mitochondrial DNA and allozyme markers. Genetics **108**: 237-255

Avise, J. C. and R. A. Lansman, 1983. Polymorphism of mitochondrial DNA in populations of higher animals. In: Evolution of Genes and Proteins (M. Nei and R. Koehn eds.). Sinauer Assoc. Inc., Sunderland, Massachusettes, pp. 147 -164

Avise, J. C., A. Bermingham, L. G. Kessler and N. C. Saunders, 1984.Characterization of mitochondrial DNA variability in a hybrid swarm between subspecies of bulegill sunfish (*Lepomis machrochirus*). Evolution **38**: 931-941.

Brown, W. M., M. George Jr., and A. C. Wilson, 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76: 1967-1976.

Brown, G. G. and M. V. Simpson, 1981. Inter-, Intraspecific variation of the mitochondrial genome in *Rattus norvegicus* and *Rattus rattus*: restriction enzyme analysis of variant mitochondrial DNA molecules and their evolutionary relationship. Genetics **97**: 125-143.

Bermingham, E. and J. C. Avise, 1986. Molecular zoogeography of freshwater fishes in the Southern United States. Genetics **113**: 939-966.

Dowling, T. E. and W. M. Brown, 1989. Allozymes, mitochondrial DNA, and levels of phylogenetic resolution among four minnow species (Notropis: Cyprinidae). Syst. Zool., **38**: 126-143

Gill, F. B., A. M. Mostrom and A. L. Mack, 1993. Speciation in North American chikadees: 1. patterns of mtDNA genetic divergence. Evolution **47**: 195-212.

Gyllenster, U. and A. C. Wilson, 1987. Intraspecific mitochondrial DNA transfer and colonization of Scandinavia by mice. Genet. Res. **49**: 25-39.

Hong, Y. H., M. S. Min and S. Y. Yang, 1993. Geographic variation of the sweet smelt, *Plescoglossus altivelis* in Korea. Bull. Inst. Basic Sci. Inha Univ. **14**: 119-125.

Johnson, N. K., J. A. Marten, and C. J. Ralph, 1989. Genetic evidence for the origin and relationships of Hawaiian honeycreepers (Aves: Fringillidae). Condor **91**: 379-396

Kang, Y. S., 1962. Illustrated encyclopedia of fauna and flora of Korea. (3) Aves. Ministry of Education. pp. 305.

Kessler, L. G. and J. C. Avise, 1984. Systematic relationships among waterfowl (Anatidae) inferred from restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA. Syst. Zool., **33(4)**: 370-380.

Kessler, L. G. and J. C. Avise, 1985. A comparative description of mitochondrial DNA differentiation in selected avian and other vertebrate genera. Mol. Biol. Evol. **2**: 109-125.

Kim, S. W., J. H. Shim and S. Y. Yang, 1986. Taxonomic study on the subspecies of two passerine birds in Korea. Bull. Inst. Basic Sci., Inha Univ. **7**: 123-131

Lee, H. Y. and C. S. Park, 1991. Genetics studies in Korean anurans: on the mitochondrial DNA differentiation in frog of the genus *Rana*. Korean J. Genetics **13**: 1-16.

Lee, H. Y., S. Y. Yang, C. S. Chang, and C. S. Park, 1989. Evolutionary study on the Dark Chub(*Zacco termmincki*). VIII. Mitochondrial DNA analysis of subfamily Danioninae (Pisces, Cyprinidae). Korean J. Genetics **11**: 175-187.

Lee, H. Y., S. Y. Yang, C. S. Park, E. K. Jung and J. H. Kim, 1994. Systematic study on the fishes of the Family Cobitidae(Pisces, Cypriniformes) 4. The analyses of karyotype and mitochondrial DNA between two species of the genus *Misgurnus* from Korea. Korean J. Zool. **37**: 439-451.

Mack, A. L., F. B. Gill, R. Colburn, and C. Spolsky, 1986. Mitochondrial DNA: A source of genetic markers for studies of similar passerine bird species. Auk **103**: 676-682.

Min, M. S. and S. Y. Yang, 1993. Isozyme and mtDNA analysis of two species of the genus *Anguilla* (Pisces, Anguillidae). Korean J. Zool. **36**: 545-555.

Min, M. S., Y. J. Kim and S. Y. Yang, 1995. MtDNA Analysis of 5 species of the genera *Moroco* and *Phoxinus*(Pisces, Leucisccinae). Korean J. Zool. **38**: 87-95.

Mortiz, D., T. E. Dowling, and W. M. Brown, 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. Annu. Rev. Ecol. Syst. **18**: 269-282.

Paik, N. K., H. Y. Lee, E. K. Jung and I. S. Kim, 1992. Genetic differentiation of mitochondrial DNA in the genera, *Enhydris* and *Elaphe*. Korean J. Genetics **14**: 89-98

Palmer, J. D., 1987. Intraspecific variation and multicirdularity in Brassica mithocondrial DNAs. Genetics **118**: 341-351.

Park, C. S. and H. Y. Lee, 1991. Systematic study on the fishes of family Cobitidae (Pisces:

Cypriniformes): Extensive variation in mithocondrial DNA among geographic populations of *Nemacheilus toni*, Korean J. Ichthyol. **3**: 140-141.

Park, B. S. J. B. Hyun and S. Y. Yang, 1990. Systematics and evolutionary study on the genus *Parus*(Passeriformes: Paridae) in Korea. Korean J. Syst. Zool. **6**: 17-28

Raikow, R. J. 1986. Why are there so many kinds of Passerine birds? Syst. Zool. **35**: 255-259.

Shim, J. H. 1994. Systematic study on the Birds of the order Passeriformes in Korea. Ph. D. dissertation, Inha Univ.

Upholt, W. B., 1977. Estimation of DNA sequence divergence from comparison of restriction endonuclease digests. Nucl. Acids Res. **4**: 1257-1265

Vawter, L. and W. M. Brown, 1986. Nuclear and mitochondrial DNA comparison reveal extream rate variation in the molecular clock. Science **234**: 194-196.

Wetmore, L. A., 1960. A classification for the birds of the world. Smiths. Misc. Cols., **139**: 37

Won, P. O., 1969. An annoted checklist of the birds of Korea. Forest Research Institude, Seoul.

Won, P. O., and M. E. Gore, 1971. The birds of Korea. Royal Asiatic Soc. and Taewon Publ. Co., Seoul. 450 pp.

Won, P. O., 1981. Illustrated flora and fauna of Korea. Ministry of Education, Seoul, Korea. Avifauna **25**: 954-1027.

Yang, S. Y. and M. S. Min, 1989. Genetic variation and speciation of fishes of the genus *Moroco* (Cyprinidae). Korean J. Zool. **32**: 75-83.

Yang, S. Y., S. R. Jeon, I. Y. Choo and J. H. Kim, 1984 Genetic variation and systematics in the subfamily Danioninae(Fishes). Bull. Inst. basic sci., Inha Univ., **5**: 111-118.

Yonekawa, H., K. Moriwahi, O. Gotch, J. I. Hayashi, J. Watanabe, N. Miyashita, M. L. Petras and Y. Tagashira, 1981. Evolutionary relationships among five subspecies of *Mus musculus* based on restriction enzyme cleavage patterns of mitochondrial DNA. Genetics **98**: 801-816.

Zimmerman, E. G., D. R. Akins, J. V. Planz and M. J. Schurr, 1988. A rapid procedure for isolating mitochondrial DNA. Gene Anal. Techn. **5**: 102-104.

Zink, R. M. and J. C. Avise, 1990. Patterns of mitochondrial DNA and allozyme evolution in the avian genus *Ammadramus*. Syst. Zool., **39(2)**: 148-161.

Zink, R. M., D. F. Lott, and D. W. Anderson, 1987. Genetic variation, population structure, and evolution of California quail. Condor, **89**: 395-405.

RECEIVED: 7 March 1997
ACCEPTED: 7 May 1997

Mitochondrial DNA analysis on 4 species of the genus *Parus* (Passeriformes: Paridae) in Korea.

Mi-Sook Min
(Dept. of Biology, Inha University, Incheon 402-751, Korea)

ABSTRACT

Mitochondrial DNA was used to investigate the phylogenetic relationships among 4 species of the genus *Parus* in Korea. Ten restriction enzymes were employed to detect the construction of mtDNA in each species. The genome size of mtDNA ranges from 16.6 Kb(*Parus varius varius*) to 17.0 Kb(*P. major wladiwostokensis*). The species specific fragment patterns were observed in the digestion with the restriction enzymes of *Pst* I and *Pvu* II. A substantial genetic divergence among species was recognized. The average value of nucleotide sequence divergence between *P. m. wladiwostokensis* and *P. a. amurensis* was the least(p=0.073, F=0.294) whereas the value of *P. a. amurensis* and *P. v. various* was the most(p=0.119, F=0.143). Assuming an evolutioary rate for mtDNA of 2% divergence per million years (Brown *et al.*, 1979), these species are speciated during late Pliocene to early Pleistocene epoch.